

Особенности реакции живых клеток на внешние воздействия, зарегистрированные в квазистатическом режиме атомно-силовой микроскопии

М.М. Халисов^{1,2}, А.В. Анкудинов^{2,3}

¹ *ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, РФ
hamax@list.ru*

² *Университет ИТМО, 197101, Санкт-Петербург, РФ*

³ *ФГБУН ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, РФ*

Атомно-силовая микроскопия в квазистатическом режиме PeakForce QNM была применена для изучения морфологии и модуля Юнга живых клеток. В физиологически адекватных условиях исследовались эритроциты, фибробласты, сенсорные нейроны.

Peculiarities of living cell response to external influences revealed via quasistatic mode atomic force microscopy

M.M. Khalisov^{1,2}, A.V. Ankudinov^{2,3}

¹ *Pavlov Institute of Physiology, 199034, St.-Petersburg, Russia
hamax@list.ru*

² *ITMO University, 197101, St.-Petersburg, Russia*

³ *Ioffe Institute, 194021, St.-Petersburg, Russia*

Quasistatic PeakForce QNM mode of atomic force microscopy has been employed to study the morphology and the Young's modulus of living cells. Erythrocytes, fibroblasts, sensory neurons were investigated under physiologically relevant conditions.

Появление щадящих квазистатических режимов атомно-силовой микроскопии (АСМ), таких как PeakForce QNM (Bruker), способствует развитию исследований живых клеток. По сравнению с традиционными режимами работы PeakForce QNM позволяет повысить информативность измерений при затрате приемлемого для клеток времени сканирования. Благодаря быстрой регистрации и обработке силовых кривых в этом режиме одновременно с информацией о рельефе поверхности можно получать карты распределения механических характеристик образца. Среди доступных характеристик модуль Юнга – параметр, который традиционно используется для оценки механических свойств объектов. Мы использовали возможности режима PeakForce QNM для изучения модуля Юнга и геометрии нескольких типов живых клеток в физиологически адекватных условиях: эритроцитов, фибробластов, сенсорных нейронов.

Эксперименты проводились на оптимизированной для биологических исследований установке, состоящей из инвертированного оптического и атомно-силового микроскопа Bruker BioScope Catalyst с температурным контроллером для термостатирования образца. Живые клетки изучались с помощью режима PeakForce QNM в жидкости при температуре 37°C. Обработка АСМ данных осуществлялась в программных пакетах NanoScope Analysis 1.50 и Gwyddion 2.44.

Способность эритроцитов к деформации является важным фактором, влияющим на эффективность кровоснабжения тканей организма. Результативным АСМ исследованиям эритроцитов мешает их экстремальная деформируемость, поэтому на практике чаще имеют дело с фиксированными, подвергнутыми специальной упрочняющей обработке, клетками. Однако такой изменяющий свойства объекта подход закрывает доступ к АСМ измерениям модуля Юнга и деформируемости клеток в их естественном, нативном состоянии. В немногочисленных АСМ исследованиях нефиксированных эритроцитов [1-4], нативные клетки иммобилизовывались на подложке, обработанной специальным веществом – полилизин. Известно, что полилизин действует на клетки. В работе [5]

утверждалось, что он вызывает распластывание эритроцитов на подложке, о чем свидетельствует приобретаемая клетками выпуклая куполообразная форма, а со временем из-за натяжения мембраны происходит их лизис. Мы наблюдали сходную картину в нашем АСМ исследовании, однако нам удалось показать, что лизису предшествует промежуточная стадия, индикатором которой является обесцвечивание эритроцитов при наблюдении в оптический микроскоп, сопровождающееся их набуханием и упрочнением [6].

Еще одним объектом изучения стали интактные фибробласты. Для их сканирования применялись два типа АСМ зондов: стандартные острые с радиусом закругления кончика 2-12 нм и специальные затупленные с приклеенной сферической частицей радиуса 325 нм) [7]. Ожидается, при АСМ сканировании острым зондом получались более детальные карты модуля Юнга. Благодаря чему, у некоторых фибробластов по АСМ картам распределения этого параметра можно было наблюдать отдельные элементы развитой сети цитоскелета. Средний модуль Юнга поверхности фибробластов при формальном вычислении по модели Снеддона (для острых кантилевров) и Герца (для сферических зондов) существенно отличался. Однако при использовании обоих типов зондов средняя максимальная высота клеток оказалась одинаковой (≈ 1.7 мкм), также как и их контактная жесткость (≈ 16.5 мН/м). Наблюдение можно объяснить тем, что внешний примембранный слой фибробласта представляет собой жесткую оболочку, деформация которой зависит лишь от величины приложенной силы [8].

Также изучалось действие коеновой кислоты (10^{-8} М) и уабаина (10^{-10} М) – веществ, обладающих анальгетическими свойствами – на живые сенсорные нейроны. Влияния на морфологию нейронов не обнаруживалось. Сравнение среднего модуля Юнга клеток показало, что под действием уабаина этот параметр оказался равным 172 ± 109 кПа ($n=15$), что выше значений у контрольных клеток – 115 ± 90 кПа ($n=30$) и нейронов, обработанных коеновой кислотой – 120 ± 97 кПа ($n=21$). Мы считаем, что результат может отражать различные пути передачи сигнала на геном клетки для коеновой кислоты (рецептор-опосредованно) и уабаина (трансдуктор-опосредованно) [9,10].

Авторы благодарны Пенниайнен В.А., Тимошенко Т.Е. за предоставление образцов с живыми клетками.

1. A.A. Mozhanova, N.I. Nurgazizov, A.A. Bukharaev, *Proceedings SPM-2003. Nizhni Novgorod*. 266 (2003).
2. M. Lekka, M. Fornal, G. Pyka-Fosciak, K. Lebed, B. Wizner, T. Grodzicki, J. Styczen // *Biorheology* **42**, 307 (2005).
3. J.L. Maciaszek, Andemariam B., Lykotrafitis G. *J. Strain Analysis*. **46**, 368 (2011).
4. L.M. Rebelo, J.S. Sousa, T.M. Santiago, J. Mendes Filho *Microscopy: advances in scientific research and education*. **1**, 141 (2014).
5. Hategan, R. Law, S. Kahn, D.E. Discher *Biophys J*. **85**. 2746 (2003).
6. М.М. Халисов, К.И. Тимошук А.В. Анкудинов, Т.Е. Тимошенко *ЖТФ* **87**, 282 (2017).
7. И.А. Няпшаев, А.В. Анкудинов, А.В. Стовпяга, Е.Ю. Трофимова, М.Ю. Еропкин *ЖТФ*. **82**, 109 (2012).
8. М.М. Халисов, А.В. Анкудинов, В.А. Пенниайнен, И.А. Няпшаев, А.В. Кипенко, К.И. Тимошук, С.А. Подзорова, Б.В. Крылов *ПЖТФ* **43**, 56 (2017).
9. М.М. Khalisov, A.V. Ankudinov, V.A. Penniyaynen, D. Dobrota, B.V. Krylov *Acta Physiol. Hung*. **102**, 125 (2015).
10. М.М. Халисов, В.А. Пенниайнен, Н.А. Есикова, А.В. Анкудинов, Б.В. Крылов *ПЖТФ* **43**, 89 (2017).